DIVERSIDAD GENÉTICA DEL TIZÓN TARDÍO DE LA PAPA [*Phytophthora infestans* (Mont) de Bary] EN CHAPINGO, MÉXICO

GENETIC DIVERSITY OF POTATO LATE BLIGHT [*Phytophthora infestans* (Mont) de Bary] AT CHAPINGO, MÉXICO

Norma M. **Alarcón-Rodríguez**, Héctor **Lozoya-Saldaña***, Ernestina **Valadez-Moctezuma**, Ma. del Rosario **García-Mateos**, María T. **Colinas-León**

Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, México. (picti87@gmail.com).

Resumen

En el altiplano central mexicano, el tizón tardío (*Phytophthora infestans*) presenta alta incidencia, severidad y diversidad genotípica, debido en parte a sus progenies derivadas sexualmente. El objetivo de este estudio fue evaluar el tipo de apareamiento, el perfil aloenzimático y el haplotipo mitocondrial de 88 aislamientos de *P. infestans* obtenidos de lesiones simples al azar de clones de papa en el campo agrícola experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, México, durante 2008, 2009 y 2010. Predominó la población homotálica (A1/A2), con una frecuencia de 0.761. Las frecuencias de los tipos A1 y A2 fueron 0.125 y 0.114. Se identificaron 25 genotipos de aloenzimas, con los alelos 100 y 122 para las peptidasas (*Pep*), y 86, 90, 100, 111 y 122 para glucosa fosfato isomerasas (*Gpi*). El genotipo más común fue A1/A2, *Pep* 100/100 y *Gpi* 86/100 (frecuencia 0.216). El índice de diversidad genotípica fue 1.8 y sólo se identificó al haplotipo mitocondrial Ia. Pocos genotipos se pudieron ubicar con precisión en alguna de las clasificaciones existentes, por lo que se consideran únicos en el área o no presentes en otras regiones. Por su diversidad genética es necesario una clasificación más amplia, que incluya a la mayoría de alelos multilocus detectados por aloenzimas y a la condición homotálica.

Palabras clave: *Solanum tuberosum* L., haplotipo mitocondrial, isoenzimas, compatibilidad.

Abstract

In the Mexican central highlands, late blight (*Phytophthora infestans*) has high incidence, severity and genotypic diversity, due in part to its sexually derived progeny. The objective of this study was to evaluate the mating type, allozyme profile and mitochondrial haplotype of 88 isolates of *P. infestans* obtained from simple random lesions of potato clones at the experimental agricultural station of the University of Chapingo, México, in 2008, 2009 and 2010. Homothallic population (A1/A2) predominated, with a frequency of 0.761. A1 and A2 frequencies were 0.125 and 0.114, respectively. Twenty five allozyme genotypes were identified, with alleles 100 and 122 for peptidase (*Pep*), and 86, 90, 100, 111 and 122 for glucose phosphate isomerase (*Gpi*). The most common genotype was A1/A2, *Pep* 100/100 and *Gpi* 86/100 (frequency 0.216). The genotypic diversity index was 1.8 and only the Ia mitochondrial haplotype was identified. Few genotypes could be located accurately in any of the existing classifications, so they are considered unique in the area or not present in other regions. For their genetic diversity a broader classification is needed, including most of multilocus alleles detected by alloenzymes and homothallic condition.

Key words: *Solanum tuberosum* L., mitochondrial haplotype, isoenzymes, compatibility.

Introducción

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary es un microorganismo perteneciente al reino Stramenopila (Chromista), Phylum Oomycota

Introduction

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary is a microorganism belonging to kingdom Stramenopila (Chromista), Phylum Oomycota (http://tarwi.lamolina.edu.pe/~gligli/OO.pdf), which has a large genetic plasticity and is an economically important pathogen in Solanaceae, such as potato (*Solanum tuberosum* L.). It is a threat to the world

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.
Recibido: mayo, 2012. Aprobado: junio, 2013.
Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 47: 593-607. 2013.

(http://tarwi.lamolina.edu.pe/~gligli/OO.pdf), que posee una gran plasticidad genética y es un patógeno de importancia económica en solanáceas, como la papa (*Solanum tuberosum* L.). Es una amenaza para la seguridad alimentaria mundial por causar el tizón tardío, enfermedad de la papa responsable de la hambruna en Irlanda en el siglo XIX. Causa manchas en hojas, tallos, pecíolos y tubérculos, que conducen a necrosis y muerte (Pérez y Forbes, 2008); por tal motivo *P. infestans* es uno de los organismos más estudiados en su reproducción, fisiología y procesos infectivos. Es necesario conocer la diversidad genética de las poblaciones de las regiones infectadas porque está relacionada con la eficacia y la eficiencia de los métodos de manejo. Entre los métodos para caracterizar su diversidad están los marcadores fenotípicos y genotípicos y los más empleados son los patrones aloenzimáticos de glucosa fosfato isomerasas (*Gpi*) y peptidasas (*Pep*), el tipo de apareamiento o compatibilidad (A1, A2), la sonda RG57 y la evaluación de haplotipos de ADN mitocondrial (ADNmt) (Griffith y Shaw, 1998; Gómez-Alpizar, *et al.*, 2007; Jaimasit y Prakob, 2010).

Phytophthora infestans es un organismo heterotálico porque requiere los tipos de apareamiento A1 y A2 para reproducirse sexualmente. El grupo de compatibilidad A1 se dispersó por el mundo desde la hambruna irlandesa de mediados del siglo XIX, y el tipo A2 se identificó en México en la década de los cincuenta, donde permaneció limitado por varias décadas más. En 1981 se encontró en Europa, Oriente Medio, Asia y Sur América, aumentando su importancia debido a su rápida dispersión y alta virulencia, adaptándose a nuevas condiciones ambientales y hospederos (Spielman *et al.*, 1991; Goodwin *et al.*, 1995a; Gilchrist *et al.*, 2009). En México se han identificado todos los haplotipos mitocondriales (Fernández *et al.*, 2005; Grünwald *et al.*, 2001), y Garay *et al.* (2007) encontraron el haplotipo lb en Tlaxcala. La mayor diversidad genotípica mundial se encuentra en el altiplano central mexicano, considerado el lugar de origen de *P. infestans* (Grünwald *et al.*, 2001; Grünwald y Flier, 2005), y el área de Chapingo al oriente del lago de Texcoco es el segundo centro de diversidad del oomiceto después del valle de Toluca (Goodwin, 1996). Esta diversidad se ha evaluado con aloenzimas, polimorfismo de fragmentos largos de restricción (RFLP) y los tipos de compatibilidad, así como mediante métodos

food security by causing late blight, potato disease responsible for famine in Ireland in the 19th century. It causes blight on leaves, stems, petioles and tubers, leading to necrosis and death (Pérez and Forbes, 2008); for this reason *P. infestants* is one of the most studied organisms in breeding, physiology and infectious processes. It is necessary to know the genetic diversity of populations in infected regions because it is related to the effectiveness and efficiency of management methods. Among the methods to characterize its diversity are phenotypic and genotypic markers and the most used are allozyme patterns of glucose phosphate isomerase (*Gpi*) and peptidase (*Pep*), mating type or compatibility (A1, A2), the probe RG57 and evaluation of mitochondrial DNA (mtDNA) haplotypes (Griffith and Shaw, 1998; Gomez-Alpizar, *et al.* 2007; Prakob and Jaimasit, 2010).

Phytophthora infestans is a heterothallic organism because requires the mating types A1 and A2 for sexual reproduction. The mating group A1 was dispersed around the world since the Irish famine of the mid-nineteenth century, and type A2 was identified in México in the fifties, where it remained limited for several decades. In 1981 it was found in Europe, Middle East and South America, increasing its importance due to its rapid dispersion and high virulence, adapting itself to new environmental conditions and hosts (Spielman *et al.*, 1991; Goodwin *et al.*, 1995a; Gil-christ *et al.*, 2009). In México, all mitochondrial haplotypes have been identified (Fernández *et al.*, 2005; Grünwald *et al.*, 2001), and Garay *et al.*, (2007) found the haplotype 1b in Tlaxcala. The largest world genotypical diversity is found in the central Mexican highlands, considered as the place of origin of *P. infestans* (Grünwald *et al.*, 2001; Grünwald and Flier, 2005), being the Chapingo area on the west of the lake of Texcoco, the second center of oomicete diversity after the Toluca Valley (Goodwin, 1996). This diversity has been evaluated with allozymes, restriction fragment length polymorphism (RFLP) and the mating types, as well as by biochemical and molecular methods (Goodwin, 1996). The use of these methodologies led to determine that populations of *P. infestans* are sub-structured from clonal lineages, often referred to by the initials of the country where they were identified and by a numerical suffix representing lineages derived from the original. For example, it is considered that isolates participating in the first mass

bioquímicos y moleculares (Goodwin, 1996). El empleo de estas metodologías llevó a determinar que las poblaciones de *P. infestans* están subestructuradas a partir de linajes clonales, frecuentemente denominados por las iniciales del país donde se identificaron y por un sufijo numérico que representa linajes derivados del original. Por ejemplo, se considera que los aislamientos que participaron en la primera migración masiva de *P. infestans* de México hacia Europa y EE.UU. pertenecen al linaje US-1, mientras que aquellos reportados en Ecuador se denominan EC-1, EC-2 y EC-3 (Adler *et al.*, 2004).

Debido a la relevancia del patógeno y a la necesidad de relacionar criterios de clasificación, el objetivo de esta investigación fue determinar la variabilidad genética de *P. infestans* en poblaciones obtenidas de clones de papa en Chapingo, México, al oriente del lago Texcoco y al pie del cerro Tláloc, y establecer su posible relación con clasificaciones existentes.

Materiales y Métodos

Aislamiento del patógeno

Durante los ciclos de cultivo de temporal de 2008, 2009 y 2010, se recolectaron aislamientos de *P. infestans* al azar, de lesiones simples, jóvenes, de hojas y tallos de lotes de 2500 genotipos pertenecientes a 100 clones de cada una de 25 familias de diversos progenitores cada año (7500 clones de 75 familias por los tres años), del Departamento de Agricultura de EE.UU. (USDA), y de la variedad Alfa como testigo susceptible y fuente de inóculo, sin fase fenológica específica, tomando el tejido con la lesión una vez que ésta aparecía por la infección natural del patógeno, en el campo agrícola experimental de la Universidad Autónoma Chapingo (UACh), Municipio de Texcoco, Estado de México, México, a 2240 m de altitud, clima templado, con temperatura media anual de 15.9 °C y una precipitación pluvial superior a los 500 mm, de junio a septiembre (http://www.bvsde.ops-oms.org/bvsaar/e/proyecto/generales/casos/texcoco.html). Los tejidos enfermos se colocaron sobre rodajas de papa sana (var. Alpha) desinfestada con hipoclorito de sodio al 2 % en agua (v/v) en cajas petri (10 cm de diámetro) para permitir el crecimiento de micelio a través del tejido, a temperatura ambiente. Al tercer día se observó el crecimiento de micelio al microscopio, y se confirmó la presencia del patógeno mediante observaciones morfológicas en preparaciones fijas. El micelio purificado se transfirió a medio sólido agar-centeno y se incubó a 21 °C para su caracterización (Grünwald *et al.*, 2001).

migration of *P. infestans* from México to Europe and the U.S. belong to the lineage US-1, whereas those reported in Ecuador are called EC-1, EC-2 and EC-3 (Adler *et al.*, 2004).

Due to the relevance of the pathogen and the need to relate classification criteria, the objective of this research was to determine the genetic variability of *P. infestans* populations from potato clones obtained in Chapingo, Mexico, east of Lake Texcoco and at the Tlaloc foothill, and establish its possible relationship with existing classifications.

Materials and Methods

Pathogen isolation

During the rainfed crops 2008, 2009 and 2010, isolates of *P. infestans* were randomly collected from young, single lesions, of leaves and stems from 2500 potato genotypes belonging to 100 clones each of 25 families from different parents each year (7500 clones of 75 families for three years), from several breeding programs from the U.S. Department of agriculture (USDA), and of the Alpha variety as susceptible control and inoculum source, without specific phenological phase, taking the tissue with lesion once it appeared by natural infection of the pathogen, at the experimental agricultural station of Chapingo University (UACh), Municipality of Texcoco, Estado de Mexico, Mexico, at 2240 masl, temperate climate, with average annual temperature of 15.9 °C and rainfall over 500 mm from June to September (http://www.bvsde.ops-oms.org/bvsaar/e/proyecto/generales/casos/texcoco.html). Disease tissues were placed on healthy potato slices (cv. Alpha) disinfested with sodium hypochlorite 2 % in water (v/v) in Petri dishes (10 cm diameter) to allow mycelium growth through the tissue, at room temperature. Mycelial growth was observed with a microscope about three days later, and the presence of the pathogen was confirmed by morphological observations in fixed preparations. Purified mycelium was transferred to a solid rye-agar medium and incubated at 21 °C for characterization (Grunwald *et al.*, 2001).

Mating type

Mating was determined by crossing isolates of *P. infestans* with a strain of known mating type (A1 or A2) kindly provided by the International Cooperative Program of the Potato Late Blight (PICTIPAPA A. C.), at Metepec, Mexico. On an agar-rye medium, in a Petri dish (10 cm diameter), the unknown type along with the known type were sown on opposite sides to

Tipo de compatibilidad

La compatibilidad se determinó cruzando los aislamientos de *P. infestans* con una cepa tipo de compatibilidad conocida (A1 o A2) proporcionada por el Programa Internacional Cooperativo del Tizón Tardío de la Papa (PICTIPAPA A. C.), en Metepec, México. En medio agar-centeno, en caja petri (10 cm de diámetro), se sembraron la cepa desconocida y la del tipo conocido en lados opuestos para que crecieran hacia el centro de la caja. Después de dos a tres semanas a 21 °C, la presencia de oosporas donde se entrecruzaron los micelios con el tipo A1, identificó al aislamiento desconocido como A2, y en el cruzamiento con el tipo A2 indicó que el aislamiento desconocido era A1. Si el mismo aislamiento formaba oosporas al cruzarse con las dos cepas de tipo conocido, se consideró homotálico (Gilchrist *et al*., 2009).

Patrones aloenzimáticos

La identificación de genotipos por aloenzimas se realizó con el método descrito por Goodwin *et al*. (1995a). Micelio de dos a tres semanas de crecimiento activo se transfirió a un tubo de microcentrífuga con 30 μL de agua destilada estéril y se maceró con una broca de plástico. Después de reposar 5 min se tomaron 10 μL para colocarlos en placas de acetato de celulosa (Titan III, Helena Laboratories). La electroforesis se realizó en amortiguador Tris-Glicina (pH 8.5) y cada enzima se reveló de acuerdo con la metodología reportada por Hebert y Beaton (1993). Para determinar la diversidad genotípica se usó el índice de Shannon-Wiener, que se basa en el concepto de equidad, adquiere valores entre cero cuando hay una sola especie y el logaritmo de S cuando todas las especies están representadas por el mismo número de individuos (Moreno, 2001):

$$H' = -\sum p_i \ln p_i$$

donde p_i=abundancia proporcional de la especie i, es decir, el número de individuos de la especie i dividido entre el número total de individuos de la muestra; ln=logaritmo base 10.

Extracción de ADN

Esta extracción se realizó mediante dos métodos. Primero, el propuesto por Griffith y Shaw (1998). El micelio crecido 10 d de cada aislamiento se maceró con 800 μL de amortiguador de extracción (NaCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 1.4 M, CTAB 2 %, EDTA 20 mM pH 8), se incubó 1 h a 65 °C, se adicionaron 600 μL de cloroformo saturado con agua,

grow towards the center of the dish. After two or three weeks at 21 °C, the presence of oospores in which mycelia were intercrossed with the type A1 identified the unknown isolate as A2, and in the crossing with type A2, indicated that the unknown isolate was A1. If the same isolate produced oospores when crossed with the two strains of known type it was considered homothallic (Gilchrist *et al*., 2009).

Allozyme patterns

Genotype identification by allozymes was obtained by the method described by Goodwin *et al.* (1995a). Mycelium of two or three weeks of active growth was transferred to a microcentrifuge tube with 30 μL of sterile distilled water and was macerated with a plastic drill. After resting 5 min 10 μL were taken to place them on cellulose acetate plates (Titan III®, Helena Laboratories). Electrophoresis was ran in a Tris-Glycine buffer (pH 8.5) and each enzyme was revealed according to the methodology reported by Hebert and Beaton (1993). To determine the genotypic diversity the Shannon-Wiener index was used, which is based on the concept of equity, takes values between zero when there is a single species and the logarithm of S when all species are represented by the same number of individuals (Moreno, 2001):

$$H' = -\sum p_i \ln p_i$$

where p_i=proportional abundance of the species i, that is, the number of individuals of the species i divided by the total number of individuals in the sample; ln=logarithm base 10.

DNA extraction

This extraction was done by two methods. First, that by Griffith and Shaw (1998). Grown mycelium for 10 d of each isolate was macerated in 800 m L of extraction buffer (NaCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 1.4 M, 2 % CTAB, EDTA 20 mM pH 8), incubated 1 h at 65 °C, 600 μL of chloroform saturated with water were added, the mixture was stirred 15 s by inversion, centrifuged 12 min at 17 900 xg, the supernatant was transferred to a clean tube and ARNase 10 μg mL^{-1} was added. Then they were incubated 1 h at 37 °C, 400 μL of isopropanol were added, incubating 20 min at −20 °C, centrifuged 12 min at 15 700 xg, the supernatant was decanted and the pellet was washed with 500 μL of ethanol at 70 % (v/v). It was again centrifuged eliminating the supernatant and the precipitate was dried at room atmosphere. It was resuspended in a buffer solution TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8) and stored at −20 °C.

la mezcla se agitó 15 s por inversión, se centrifugó 12 min a 17 900 xg, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se adicionó ARNsa 10 μg mL^{-1}. Después se incubaron 1 h a 37 °C, se adicionaron 400 μL de isopropanol incubándose 20 min a -20 °C, se centrifugó 12 min a 15 700 xg, el sobrenadante se decantó y el sedimento se lavó con 500 μL de etanol a 70 % (v/v), se volvió a centrifugar eliminando el sobrenadante y el precipitado se secó a temperatura ambiente. Se resuspendió en solución amortiguadora TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8) y se guardó a -20 °C.

El segundo método fue el propuesto por Goodwin *et al*. (1992). El micelio se maceró con 900 μL de amortiguador de extracción (EDTA 0.5 M, Tris 1 M pH 8, NaCl 1.4 M, SDS 20 % y β-mercaptoetanol). Después de incubar 1 h a 65 °C, se adicionaron 450 μL de acetato de amonio 7.5 M y la mezcla se mantuvo 20 min en hielo. Se centrifugó 10 min a 12 300 xg, el sobrenadante se transfirió y se incorporaron 800 μL de isopropanol para precipitar en hielo por 30 min, se centrifugó 5 min a la misma velocidad, se decantó el isopropanol y el precipitado se lavó con etanol a 70 % (v/v) y la pastilla se secó invirtiendo el tubo a temperatura ambiente. El precipitado se resuspendió con 450 μL de amortiguador TE (Tris 10 mM pH 8, EDTA 0.5 M) y 1 μL de ARNsa A, y reposó toda la noche a 4 °C. Al otro día se adicionaron 450 μL de la mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó 5 min a 17 900 xg, el sobrenadante se precipitó con la adición de 45 μL de acetato de sodio 3 M y 1 mL de etanol a 95 % (v/v) por 60 min, se centrifugó la mezcla a la misma velocidad por 5 min y el precipitado se resuspendió en 100 μL de amortiguador TE pH 7.5.

Haplotipos mitocondriales

Para determinar haplotipos se realizaron las amplificaciones con los iniciadores propuestos por Griffth y Shaw (1998): P1 (Forward 5'-GCAATGGGTAAATCGGCTCAA-3', Reverse 5'-AAACCAT AAGGACCACACAT-3'); P2 (Forward 5'-TTCCCTTTGTCCTCTACCGAT-3'; Reverse 5'-TTACGGCGGTTTAGCACATACA-3'); P3 (Forward 5'-ATGGTAGA GCGTGGGAATCAT-3', Reverse 5'-AATACCGCCTTTGGGTCCATT-3') y P4 (5'- T GGTCATCCAGAGGTTTATGT-3') (Integrated DNA Technologies, USA). Las condiciones de amplificación para la reacción en cadena de la polimerasa fueron las siguientes: dNTP's 200 μM, $MgCl_2$ 2.75 mM, 10 picomoles de cada iniciador, albúmina de suero de bovino (BSA) 160 μg mL^{-1}, amortiguador de PCR 1x, Go Taq DNA polimerasa 1U (Promega), ADN 20 ng en un volumen final de 25 μL; el programa de PCR fue un ciclo a 94 °C por 1.5 min seguido de 35 ciclos de 94 °C 40 s, 55 °C 60 s, 72 °C 90 s con una extensión final a 72 °C por 5 min (Applied Byosistems 9700).

The second method was described by Goodwin *et al*. (1992). The mycelium was macerated with 900 μL of extraction buffer (EDTA 0.5 M, Tris 1 M pH 8, NaCl 1.4 M, SDS 20 % and β-mercaptoethanol). After incubating 1 h at 65 °C, 450 μL of ammonium acetate 7.5 M were added and the mixture was maintained 20 min on ice. It was centrifuged at 12 300 xg for 10 min, the supernatant was transferred and 800 μL of isopropanol were incorporated to precipitate on ice for 30 min, centrifuged for 5 min at the same speed, the isopropanol was decanted and the precipitate was washed with ethanol 70 % (v/v) and the pellet was dried by inverting the tube at room temperature. The pellet was resuspended with 450 μL of buffer TE (Tris 10 mM pH 8, EDTA 0.5 M) and 1 μL of ARNase A, and rested overnight at 4 °C. The next day 450 μL of the chloroform-isoamyl alcohol (24:1) mixture was added. It was centrifuged at 17 900 xg for 5 min, the supernatant was precipitated by adding 45 μL of sodium acetate 3 M and 1 mL of ethanol at 95 % (v/v) for 60 min, the mixture was centrifuged at the same speed for 5 min and the pellet was resuspended in 100 μL of buffer TE pH 7.5.

Mitochondrial haplotypes

For determining haplotypes, amplifications were obtained with primers proposed by Griffith and Shaw (1998): P1 (Forward 5'-GCAATGGGTAAATCGGCTCAA-3', Reverse 5'-AAACCAT AAGGACCACACAT-3'), P2 (Forward 5'-TTCCCTTTGTCCTCTACCGAT-3'; Reverse 5'-TTACGGCGGTTTAGCACATACA-3', P3 (Forward 5'-ATGGTAGA GCGTGGGAATCAT-3', Reverse 5'-AATACCGCCTTTGGGTCCATT-3') and P4 (5'-T GGTCATCCAGAGGTTTATGT-3') (Integrated DNA Technologies, USA). The amplification conditions for the chain reaction of polymerase were: dNTP's 200 μM, $MgCl_2$ 2.75 mM, 10 pmol of each primer, bovine serum albumin (BSA) 160 μg mL^{-1}, buffer PCR1x, Go Taq DNA polymerase 1U (Promega), DNA 20 ng in a final volume of 25 mL; the PCR program was one cycle at 94 °C for 1.5 min followed by 35 cycles of 94 °C 40 s, 55 °C 60 s, 72 °C 90 s with a final extension at 72 °C for 5 min (Applied Biosystems 9700). Amplicons were visualized on 1.2 % agarose gels (p/v), run buffer Tris-HCl-acetic acid-EDTA (TAE) at 90 V for 90 min, stained with ethidium bromide. For digestion of each amplified 4 μL of the PCR product were taken as directed by the company (Promega). P1 products were digested with *Cfo*I (Promega) for 1 h, P2 fragment with *Msp*I (Promega) for 16 h and the fragments obtained from P3 and P4 with *Eco*RI (Promega) for 1 h. Then they were visualized on 1.8 % agarose gels (w/v) in electrophoresis with run buffer Tris-borate-EDTA (TBE) at 50 V for 90 min. Images were

Los amplicones se visualizaron en geles de agarosa a 1.2 % (p/v), amortiguador de corrida Tris-HCl-ácido acético-EDTA (TAE) a 90 V por 90 min, teñidos con bromuro de etidio. Para la digestión de cada amplificado se tomaron 4 μL del producto de PCR según las indicaciones de la empresa (Promega). Los productos de P1 se digirieron con *Cfo*I (Promega) por 1 h, el fragmento P2 con *Msp*I (Promega) por 16 h y los fragmentos obtenidos de P3 y P4 con *EcoR*I (Promega) por 1 h. Después se visualizaron en geles de agarosa a 1.8 % (p/v) en electroforesis con amortiguador de corrida Tris-borato-EDTA (TBE) a 50 V por 90 min. Las imágenes fueron fotodocumentadas con el programa Quanty One (BioRad). Para el fragmento P2, la digestión se visualizó en gel de poliacrilamida al 8 % (p/v) y fue teñido con nitrato de plata (0.2 % p/v).

Análisis estadístico

Los patrones aloenzimáticos se codificaron en una matriz de presencia y ausencia, se analizaron con el método UPGMA lo cual permitió la agrupación de los genotipos a partir de la población total, mediante el coeficiente Simple Matching (SM o coincidencias simples), en el programa NTSYS 2.2.

Resultados y Discusión

Aislamiento del patógeno

En los tres años de recolección se seleccionaron 88 aislamientos (Cuadro 1) y presentaron características morfológicas típicas de la especie, como micelio cenocítico, morfología del esporangio, evolución del anteridio y oogonio para formar la oos pora, y las diferencias de los flagelos de las zoosporas (pluma y látigo; Pérez y Forbes, 2008; Jaimasit y Prakob, 2010). En las pruebas realizadas en el ciclo 2008 no se

photodocumented with Quanty One program (BioRad). For fragment P2, digestion was visualized on 8 % polyacrylamide gel (w/v) and stained with silver nitrate (0.2 % w/v).

Statistical analysis

Allozyme patterns were coded in a presence-absence matrix; they were analyzed using the UPGMA method which allowed the grouping of genotypes from the total population by the Simple Matching coefficient (SM or simple matches) in the program NTSYS 2.2.

Results and Discussion

Pathogen isolation

In the three years of collection 88 isolates were selected (Table 1) and they showed morphological characteristics typical of the species, such as coenocytic mycelium, sporangium morphology, evolution of the antheridium and oogonium to form the oospore, and differences of pen and whip oospores flagella (Pérez and Forbes, 2008; Jaimasit and Prakob, 2010). In tests performed in the cycle 2008 there were no differences between isolates of leaf and stem; therefore, in subsequent field growing cycles only isolates of foliage were obtained.

Mating type

Two mating types were presented with a frequency of 0.125 (A1) and 0.114 (A2), keeping the ratio of 1:1, although homothallic strains (A1/A2) predominated with a frequency of 0.761. In

Cuadro 1. Aislamientos seleccionados de *Phytophthora infestans* obtenidos de los clones de papa del Programa de Mejoramiento Genético del USDA en el campo agrícola experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, México.

Table 1. *Phytophthora infestans* selected isolates obtained from potato clones of the USDA Breeding Program at the agricultural experimental station of Universidad Autónoma Chapingo, México.

Año	Muestra	Número de aislamientos
2008	Tallo	6
2008	Hoja	26
2009	Hoja	40
2010	Hoja	16
Total		88

observaron diferencias entre los aislamientos de hoja y tallo; por tanto, en los siguientes ciclos solamente se hicieron aislamientos del follaje.

Tipo de compatibilidad

Dos tipos de compatibilidad se presentaron con una frecuencia de 0.125 (A1) y 0.114 (A2), guardando la proporción 1:1, aunque predominaron las cepas homotálicas (A1/A2) con una frecuencia de 0.761. En el valle de Toluca predominan los A1 y los A2 en la proporción 1:1 sin homotálicos (Grünwald *et al*., 2001; Gómez-Alpizar *et al*., 2007), y en Michoacán su frecuencia fue 0.038 (Fernández *et al*., 2005). Las poblaciones homotálicas son altamente virulentas y variables, lo cual les permitió adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Silva *et al*., 2009), y pudieran representar una ventaja selectiva porque se puede generar reproducción sexual por sí misma, aunque con endogamia. En la séptima generación de reproducción homotálica solamente permanece 1 % de la heterocigosidad original (Goodwin, 1997). La causa de la abundancia de aislamientos homotálicos en Chapingo se desconoce, pero es posible que las lesiones se tomaran de plantas resistentes al patógeno. Estas plantas no son fácilmente infectadas por las variantes silvestres de *P. infestans*. La infectividad se reduce a una sección de la población del patógeno que es altamente agresiva, característica de homotálicos. También, la ausencia de hospedantes silvestres no favoreció la heterogeneidad del oomiceto (Lozoya *et al*., 2006). Otra posible presión de selección hacia la prevalencia de homotálicos pudiera ser haber tomado lesiones simples tempranas, esto es, de inicio del ciclo, sin oportunidad de intercambio genético con otras variantes comunes en epidemias avanzadas con múltiples lesiones foliares. Se ha reportado mayor diversidad si hay dos o mas lesiones en una hoja (Flier *et al*., 2003).

Patrones aloenzimáticos

Los genotipos obtenidos se describieron en términos de la movilidad relativa de las bandas en un campo eléctrico, donde el alelo más común es el que presenta la movilidad de 100 (Hernández y Gómez, 2005). En el presente estudio se observó una gran cantidad de genotipos de aloenzimas en los aislamientos, identificándose los alelos 92, 100

the Valley of Toluca A1 and A2 predominated in 1:1 ratio without homothallic (Grünwald *et al*., 2001, Gomez-Alpizar *et al*., 2007), and in Michoacán their frequency was 0.038 (Fernández *et al*., 2005). Homothallic populations are highly virulent and variables, which allowed them to adapt to different environmental conditions (Silva *et al*., 2009), and could represent a selective advantage because they can generate sexual reproduction by themselves, but with inbreeding. In the seventh generation of homothallic reproduction remains only 1 % of the original heterozygosity (Goodwin, 1997). The cause of the abundance of homothallic isolates in Chapingo is unknown, but it is possible that the lesions were taken from the pathogen-resistant plants. These plants are not easily infected by wild variants of *P. infestans*. The infectivity is reduced to a section of the pathogen population that is highly aggressive, characteristic of homothallic strains. Also, the absence of wild hosts did not favor oomycete heterogeneity (Lozoya *et al*., 2006). Another possible selection pressure towards homothallic prevalence could be the simple early lesions that were taken, that is, at the beginning of the cycle, with no opportunity to genetic exchange with other common variants in advanced epidemics with multiple foliar lesions. Greater diversity has been reported if there are two or more lesions on a leaf (Flier *et al*., 2003).

Allozyme patterns

The genotypes obtained were described in terms of relative mobility of the bands on an electric field, where the most common allele is the one that presents mobility of 100 (Hernández and Gómez, 2005). In the present study a large amount of allozyme genotypes in the isolates was observed, identifying alleles 92, 100 and 122 for peptidase (*Pep*), and 86, 90,100, 111 and 122 for glucose phosphate isomerase (*Gpi*). The most frequent genotype showed bands 100/100 *Pep* and 86/100 for *Gpi*. By considering the type of mating with the allozyme alleles reported, 24 multilocus genotypes were identified (Table 2). Of these, just some non-homothallic have been reported for the valley of Toluca (Godwin *et al*., 1992; Flier *et al*., 2003; Lozoya *et al*., 2005). However, for homothallic isolates no reports were found; only the genotype

y 122 para las peptidasas (*Pep*), y 86, 90,100, 111 y 122 para glucosa fosfato isomerasa (*Gpi*). El genotipo más frecuente presentó bandas 100/100 para *Pep* y 86/100 para *Gpi*. Al considerar el tipo de apareamiento junto con los alelos aloenzimáticos reportados, se identificaron 24 genotipos multilocus (Cuadro 2). De estos, sólo algunos no homotálicos se han reportado para el valle de Toluca (Godwin *et al*., 1992; Flier *et al*., 2003; Lozoya *et al*., 2005). Sin embargo, para los aislamientos homotálicos no se encontraron reportes; solamente el genotipo *Gpi* 100/100 y *Pep* 100/100 en Saltillo, Coahuila, el *Gpi* 100/100 en Polonia y *Gpi* 90/100 en Holanda (Gavino y Fry, 2002).

Gpi 100/100 and *Pep* 100/100 in Saltillo, Coahuila, the *Gpi* 100/100 in Poland and *Gpi* 90/100 in the Netherlands (Gavino and Fry, 2002).

None of the genotypes identified can be adjusted to current classifications of the pathogen, although there are many profiles. Genotypic diversity calculated for isolates of Chapingo was 1.8, using the Shannon index, which shows great genetic diversity, despite being a value less than that reported for the Toluca Valley (Grünwald *et al*., 2001). This decrease is explained by the homothallic character of clonal nature presented by most of the isolates of this study; however, the diversity doubled to 0.92 reported for Chapingo (Goodwin, 1996),

Cuadro 2. Frecuencia de los genotipos de *Phytophthora infestans* identificados de acuerdo con el tipo de compatibilidad y aloenzimas *Pep* y *Gpi*.
Table 2. Frequency of *Phytophthora infestans* genotypes identified according to the mating type and *Pep* and *Gpi* allozymes.

Genotipo	TC	*Pep*	*Gpi*	Número de aislamientos	Frecuencia	Genotipo en otras clasificaciones
1	A1	100/100	86/111	3	0.034	-
2	A1	100/100	100/111/122	3	0.034	-
3	A1	100/100	86/122	1	0.011	-
4	A1	100/100	86/100/111	1	0.011	-
5	A1	100/100	86/100	2	0.024	US-1
6	A1	92/100	100/100	1	0.011	US-5, US-6
7	A2	100/100	86/122	2	0.024	-
8	A2	100/100	86/100	4	0.045	CA-3
9	A2	100/100	100/122	2	0.024	US-14
10	A2	100/100	100/111/122	1	0.011	US-8
11	A2	100/122	86/100/122	1	0.011	-
12	A2	100/122	86/122	1	0.011	-
13	A1,A2	100/100	100/122	5	0.057	-
14	A1,A2	100/100	100/100	10	0.113	PE-3
15	A1,A2	100/100	86/100/111	5	0.057	-
16	A1,A2	100/100	86/100/122	12	0.136	-
17	A1,A2	100/100	86/100	19	0.216	-
18	A1,A2	100/100	86/111	2	0.024	-
19	A1,A2	100/100	86/122	1	0.011	-
20	A1,A2	100/100	90/100	4	0.045	-
21	A1,A2	100/122	86/100/122	3	0.034	-
22	A1,A2	100/122	86/100	1	0.011	-
23	A1,A2	100/122	86/100/111	1	0.011	-
24	A1,A2	92/100	100/122	3	0.034	-

TC=tipo de apareamiento; *Pep*=peptidasa; *Gpi*=glucosa fosfato isomerasa ❖ TC=mating type; *Pep*=peptidase; *Gpi*=glucose phosphate isomerase.

Ninguno de los genotipos identificados se puede ajustar a las clasificaciones actuales del patógeno, aunque hay muchos perfiles. La diversidad genotípica calculada para los aislamientos de Chapingo fue 1.8, usando el índice de Shannon, lo cual muestra una gran diversidad genética, a pesar de ser un valor menor al reportado para el valle de Toluca (Grünwald *et al*., 2001). Esta disminución se explica por el carácter homotálico de índole clonal presentado por la mayoría de los aislamientos de este estudio; sin embargo, la diversidad duplicó al 0.92 reportado para Chapingo (Goodwin, 1996), lo cual coincide con la afirmación de Gilchrist *et al.* (2009) de que al transcurrir el tiempo aumenta la diversidad en las poblaciones del patógeno. El alelo 122 de *Gpi* está presente en EE.UU. (Goodwin *et al*., 1995b), mientras que en México se encuentra en aislamientos heterotálicos y homotálicos (Grünwald *et al*., 2001; Fernández *et al*., 2005; Lozoya *et al*., 2005). El genotipo A1/A2 90/100 para Gpi fue reportado en Polonia, el genotipo A1,A2 100/100 *Gpi* y 100/100 *Pep* fue descrito para Saltillo, Coahuila, y el genotipo A1 86/100, 100/100 se identificó en Canadá y Perú, todos ellos durante la década de 1980 a 1990 (Gavino y Fry, 2002).

La diversidad genética observada en este estudio constata lo reportado para la región central de México en general, y ahora para el área de Chapingo, donde predomina la reproducción sexual del patógeno, se observó la gran heterogeneidad de las poblaciones de *P. infestans* en los 24 genotipos identificados a partir de 88 aislamientos en el área de estudio. Esto es muy semejante a las 15 variantes reportadas por Matuszak *et al.* (1994) a partir de 33 aislamientos de un solo campo de papa.

De los genotipos identificados en este estudio, se puede asociar el genotipo A1 86/100 *Gpi*, 100/100 *Pep* con el US-1; el genotipo A1 100/100, 92/100 se asoció con el US-5, (Gavino y Fry, 2002; Wangsomboondee *et al*., 2002) y con US-6 (Forbes *et al*., 1998). La diferenciación entre éstos se basa en fragmentos de restricción (RFLP). El genotipo identificado en Chapingo como A2 86/100, 100/100, sería el equivalente al CA-3. Otros genotipos tipo A2 se pueden asociar con el US-14 y US-8 (Goodwin *et al*., 1998). Sin embargo, la mayoría de genotipos no se integran a las clasificaciones actuales del patógeno (Cuadro 2), porque tanto el sistema de clasificación norteamericano "US" como otros sistemas sólo integran a genotipos heterotálicos, which coincides with the statement of Gilchrist *et al.* (2009) that as time goes by the diversity in pathogen populations increases. Allele 122 of *Gpi* is present in U.S. (Goodwin *et al*., 1995b), whereas in México it is found in heterothallic and homothallic isolates (Grünwald *et al*., 2001, Fernandez *et al*., 2005; Lozoya *et al*., 2005). Genotype A1/A2 90/100 for *Gpi* was reported in Poland, genotype A1, A2 100/100 *Gpi* and 100/100 *Pep* was described for Saltillo, Coahuila, and genotype A1 86/100, 100/100 was identified in Canada and Peru, all of them during the decade of 1980-1990 (Gavino and Fry, 2002).

The genetic diversity observed in this study confirmed what was reported for the central region of México in general, and now for Chapingo area, where the sexual reproduction of the pathogen predominates, the greatest heterogeneity of the populations of *P. infestans* was observed in the 24 genotypes identified from 88 isolates in the study area. This is very similar to the 15 variants reported by Matuszak *et al.* (1995) from 33 isolates from just one potato field.

Of the genotypes identified in this study, the genotype A1 86/100 *Gpi*, 100/100 *Pep* may be associated with the US-1; genotype A1 100/100, 92/100 was associated with the US-5, (Gavino and Fry, 2002; Wangsomboondee *et al*., 2002) and with US-6 (Forbes *et al*., 1998). Differentiation between these is based on restriction fragments (RFLP). The genotype identified in Chapingo as A2 86/100, 100/100, would be equivalent to CA-3. Other genotypes A2 type may be associated with the US-14 and US-8 (Goodwin *et al*., 1998). However, the majority of genotypes are not integrated to current classifications of the pathogen (Table 2), because both the U.S. classification system "U.S." as other systems integrate only heterothallic genotypes, and although there are homothallics in the central region of México in Michoacán and Saltillo, they have been mentioned for Poland and the Netherlands during the 1980s and 1990s (Gavino and Fry, 2002; Fernandez *et al*., 2005), but not including isolates found in the present study.

Gpi, *Pep* and mating type patterns were analysed by the Simple Matching coefficient (SM or simple matches) in the NTSYS 2.2 program, which allowed the association of 24 groups (genotypes) from 88 isolates studied (Table 2).

y aunque hay homotálicos en la región central de México, en Michoacán y en Saltillo, se han mencionado para Polonia y Holanda durante la década de 1980 y 1990 (Gavino y Fry, 2002, Fernández *et al*. 2005), pero sin incluir a los aislamientos encontrados en el presente estudio.

Los patrones de *Gpi*, *Pep* y grupos de compatibilidad se analizaron mediante el coeficiente Simple Matching (SM o coincidencias simples), en el programa NTSYS 2.2, el cual permitió la asociación de 24 grupos (genotipos) a partir de los 88 aislamientos estudiados (Cuadro 2).

Haplotipos mitocondriales

Extracción de ADN

Resultados mejores se obtuvieron con el método descrito por Griffith y Shaw (1998), porque se extrajo 140 hasta 400 ng μL^{-1}, con una calidad de 1.7 hasta 1.9 (Abs 260/280). Por el contrario, con el método de Goodwin *et al.* (1992) se extrajo menor cantidad de ADN (11 a 200 ng μL^{-1}), y la calidad varió de 1.4 hasta 1.8 (Abs 260/280). También hubo mejores amplicones con el ADN obtenido con el primer método, por lo cual en los estudios posteriores se usó el método de Griffith y Shaw (1998).

Haplotipos mitocondriales

Para los iniciadores P1 se obtuvo una amplificación monomórfica para todas las muestras y el resultado fue un fragmento de 1118 pb (Figura 1A). Para realizar la digestión del producto de P1 se empleó la enzima *Hha* I. El tamaño de los fragmentos fue de 211pb y 907 pb (Figura 1B). Estos fragmentos fueron similares a lo reportado por Griffith y Shaw (1998), asociándose con el haplotipo Ia o Ib.

Para los iniciadores P2 (F2, R2) hubo dos bandas, una claramente definida de 1070 pb, y otra poca intensa de 750 pb (Figura 2A). La digestión del fragmento de 1070 pb se realizó usando la enzima de restricción *Msp* I y se obtuvieron los fragmentos de 203 y 641 pb (Figura 2B), lo cual indicó una relación con el haplotipo Ia (Griffith y Shaw, 1998; Botez *et al*., 2007). Para lograr una mejor resolución de fragmentos de digestión y verificar que no se presentara la banda de 79 pb que mencionan Griffith y Shaw (1998) como ausente para este haplotipo, se hizo un

Mitochondrial haplotypes

DNA extraction

Better results were obtained with the method described by Griffith and Shaw (1998), because it was extracted from 140 to 400 ng μL^{-1}, with a quality of 1.7 to 1.9 (Abs 260/280). Less DNA was extracted (11 to 200 ng μL^{-1}) with the method of Goodwin *et al.* (1992), and quality ranged from 1.4 to 1.8 (Abs 260/280). Also there were better amplicons with DNA obtained with the first method, whereby in subsequent studies it was used the method of Griffith and Shaw (1998).

Mitochondrial haplotypes

For P1 primers a monomorphic amplification for all samples was obtained and the result was a fragment of 1118 pb (Figure 1A). For the digestion of the product of P1, enzyme *Hha* I was used. The size of the fragments was 211bp and 907 pb (Figure 1B). These fragments were similar to those reported by Griffith and Shaw (1998), associated with haplotype Ia or Ib.

There were two bands for primers P2 (F2, R2), one clearly defined of 1070 bp, and other of short intense of 750 bp (Figure 2A). Digestion of the fragment 1070 bp was performed using the restriction enzyme *Msp* I and fragments 203 and 641 bp were obtained (Fig. 2B), which indicated a relation with haplotype Ia (Griffith and Shaw, 1998; Botez *et al*., 2007). To achieve a better resolution of digestion fragments and verify that band 79 bp mentioned by Griffith and Shaw (1998) as absent for this haplotype was not present, an electrophoresis running was carried out on 8 % polyacrylamide gel in which such band was not obtained; this gel is not presented in the results.

The amplification of product of P3 (F3, R3) was also monomorphic in all samples. The size of the amplified product was 1308 bp (Figure 3A). For its digestion the enzyme *Eco* RI was used and bands 230 bp and 1078 bp (Figure 3B) were obtained, which were associated with haplotypes Ia or Ib.

Finally, amplification of the fragment P4 (F4, R4) was 964 bp (Figure 4A). Enzyme *Eco* RI was used for the digestion from which resulted four fragments of 209 bp, 394 bp, 750 bp and

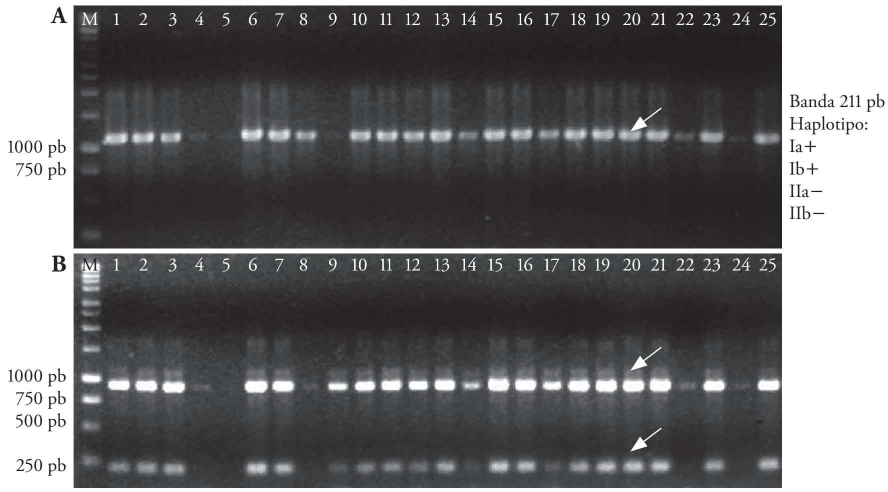


Figura 1. A) Amplificación del producto P1 DNA mitocondrial (1118 pb). B) Digestión del fragmento P1 por la enzima *Hha* I productos 211 pb y 907 pb. En ambos casos M=marcador de peso molecular (1Kb Fermentas), 1 a 24 son los distintos genotipos y carril 25 repetición del genotipo 24. Geles de agarosa al 2 %.

Figure 1. A) Amplification of the product P1 mitochondrial DNA (1118 bp). B) Digestion of fragment P1 by the enzyme *Hha* I products 211 bp and 907 bp. In both cases M=molecular weight marker (1Kb Fermentas), 1 to 24 are the various genotypes and lane 25 repetition of genotype 24. Agarose gel 2 %.

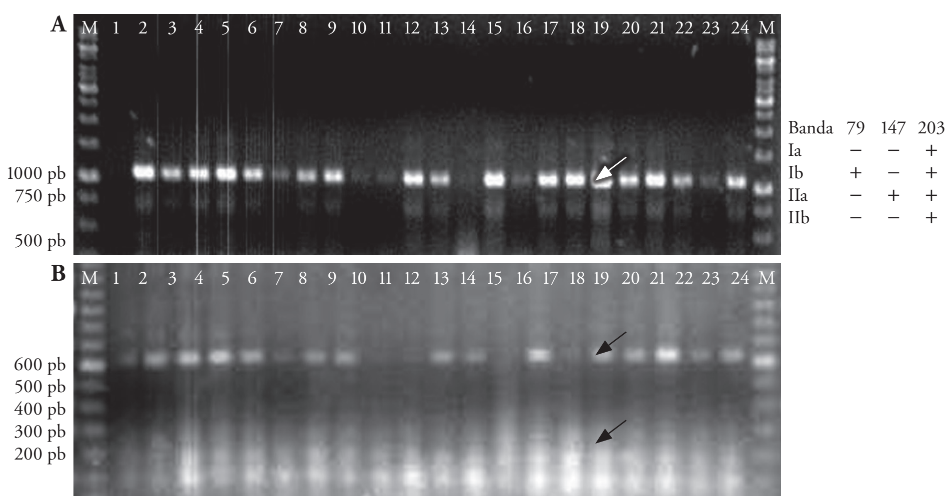


Figura 2. A) Amplificación del producto P2 DNA mitocondrial (1070 pb). M=marcador de peso molecular (1Kb Fermentas). B) Digestión del fragmento P2 por la enzima *Msp* I productos 203 y 641 pb, M=marcador de peso molecular (100 pb Fermentas). En ambos casos 1 a 24 son los distintos genotipos. Geles de agarosa 2 %.

Figure 2. A) Amplification of product P2 mitochondrial DNA (1070 bp). M=molecular weight marker (1Kb Fermentas). B) Digestion of fragment P2 by enzyme *Msp* I products 203 and 641 bp, M=molecular weight marker (100 bp Fermentas). In both cases 1 to 24 are the various genotypes. Agarose gel 2 %.

corrimiento en un gel de poliacrilamida al 8 % en el que no se obtuvo dicha banda; este gel no se presenta en los resultados.

La amplificación del producto de P3 (F3, R3) también fue monomórfica en todas las muestras. El tamaño del producto amplificado fue 1308 pb (Figura 3A). Para su digestión se utilizó la enzima *Eco* RI y se obtuvieron bandas de 230 pb y 1078 pb (Figura 3B), las cuales se asociaron a los haplotipos Ia o Ib.

Por último, la amplificación del fragmento P4 (F4, R4) fue 964 pb (Figura 4A). La enzima *Eco* RI se usó para la digestión, de la cual resultaron cuatro fragmentos de 209 pb, 394 pb, 750 pb y 800 pb (Figura 4 B); el primero es característico del haplotipo Ia.

De acuerdo con los patrones de restricción de los cuatro fragmentos, el haplotipo se identificó como Ia, ya reportado para el centro de México (Gavino y Fry, 2002; Flier *et al*., 2003). Este haplotipo está relacionado con el linaje EC-3 y el tipo de apareamiento A1 y A2 (Adler *et al*., 2004; Gavino y Fry, 2002) y

800 bp (Figure 4B), the former being characteristic of haplotype Ia.

According to the restriction patterns of the four fragments, the haplotype was identified as Ia, as reported for central México (Gavino and Fry, 2002; Flier *et al*., 2003). This haplotype is associated with lineage EC-3 and the mating type A1 and A2 (Adler *et al*., 2004; Gavino and Fry, 2002) and lineage EC-1 (Silva *et al*., 2009). However, it is present here for both types A1, A2 and for homothallic (A1/A2) with various allozyme genotypes.

There are three factors that promote and explain the great genetic diversity of *P. infestans* in the Mexican central highlands: 1) the presence of sexual mating types of the microorganism which favors genetic exchange (Grunwald *et al*., 2001); 2) abundance of wild species of the natural host of the oomycete, the genus *Solanum*, mainly from the Tarascan hills in Michoacán, to the heights of San Cristóbal de las Casas in Chiapas, where host and pathogen coexist and co-evolve simultaneously

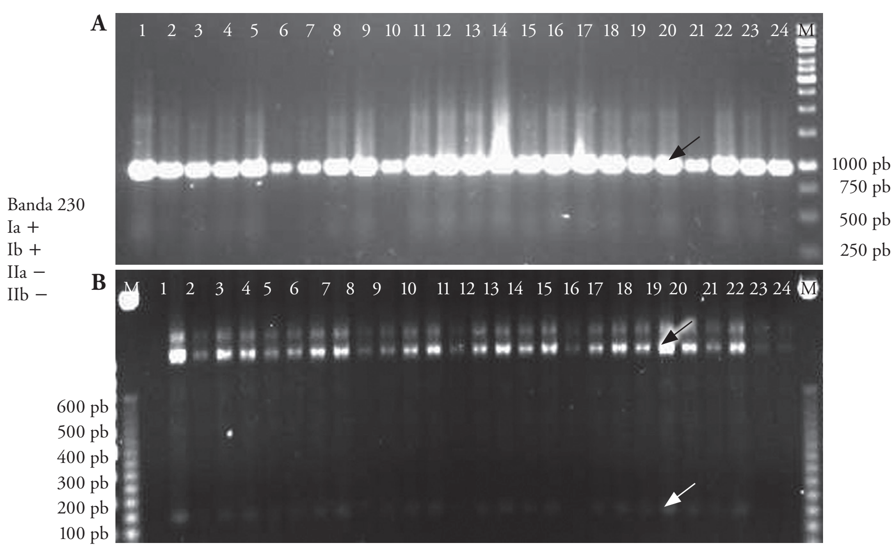


Figura 3. A) Amplificación del producto P3 DNA mitocondrial (1308 pb). M=marcador de peso molecular (1Kb Fermentas). B) Digestión del fragmento P3 por la enzima *Eco* RI productos 230 y 1078 pb, M=marcador de peso molecular (100 pb Fermentas). En ambos casos 1 a 24 los distintos genotipos. Geles de agarosa 2 %.

Figure 3. A) Amplification of product P3 mitochondrial DNA (1308 bp) M=molecular weight marker (1Kb Fermentas). B) Digestion of the fragment P3 by the enzyme *Eco* RI products 230 and 1078 bp, M=molecular weight marker (100 bp Fermentas). In both cases 1 to 24 are the various genotypes. Agarose gel 2 %.

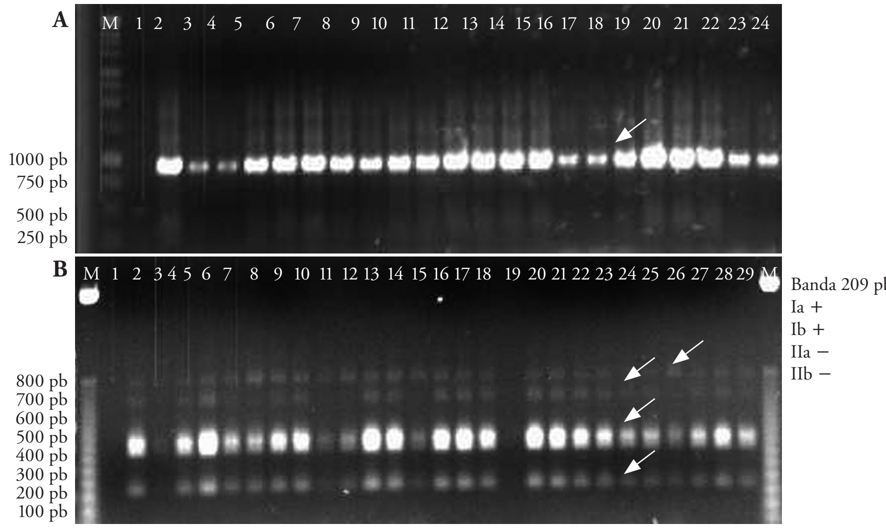


Figura 4. A) Amplificación del producto P4 DNA mitocondrial (COX 964 pb). M=marcador de peso molecular (1Kb Fermentas). Carril 1 a 24 son los distintos genotipos. B) Digestión del fragmento P4 por la enzima *Eco* RI productos 209, 394, 750 y 800 pb, M=marcador de peso molecular (100 pb Fermentas). Carriles de 1 a 24 los 24 distintos genotipos, carril 25 a 29 repetición de los genotipos 1 al 5. Geles de agarosa 2 %.

Figure 4. A) Amplification of product P4 mitochondrial DNA (964 bp COX). M=molecular weight marker (1Kb Fermentas). Lane 1-24 are the different genotypes. B) Digestion of the fragment P4 by the enzyme *Eco* RI products 209, 394, 750 and 800 bp, M=molecular weight marker (100 bp Fermentas). Lanes 1 to 24, 24 different genotypes, lane 25 and 29 repetition of genotypes 1 through 5. Agarose gels 2 %.

con el linaje EC-1 (Silva *et al.*, 2009). Sin embargo, aquí se presentó tanto para los tipos A1, A2 como para homotálicos (A1/A2) con distintos genotipos aloenzimáticos.

Hay tres factores que favorecen y explican la gran diversidad genética de *P. infestans* en el altiplano central mexicano: 1) la presencia de grupos de compatibilidad sexual del microrganismo que favorece el intercambio genético (Grünwald *et al.*, 2001); 2) la abundancia de especies silvestres del hospedante natural del oomiceto, el género *Solanum*, principalmente desde la sierra tarasca, en Michoacán, hasta los altos de San Cristóbal de las Casas, en Chiapas, donde el hospedero y el patógeno cohabitan y coevolucionan simultáneamente (Spooner *et al.*, 2004); 3) el clima ideal de gran altitud (más de 1500 m) con temperaturas entre 10 y 20 °C y abundantes y confiables lluvias en el verano, con humedad relativa superior al 90 %, ideal para el desarrollo del tizón (Krause *et al.*, 1975).

(Spooner *et al.*, 2004); 3) ideal climate of high altitude (over 1500 m) with temperatures between 10 and 20 °C and abundant and reliable rainfall in the summer, with relative humidity above 90 %, is ideal for blight development (Krause *et al.*, 1975).

Variability found in the pathogen population in Chapingo was predictable, but this diversity has not been quantified. This new knowledge can be used to design strategies for management and control in the region, if in future studies variability of the pathogen is associated with its resistance to fungicides. In addition there was a need to establish broader and inclusive classification criteria, which may locate different genotypes detected in this study and homothallic isolates due to the fact that current systems (U.S. for the U.S., EC to Ecuador, CA for Canada) do not incorporate them because they do not have them in their geographical places or countries, where such systems were designed.

La variabilidad encontrada en la población del patógeno en Chapingo era predecible, pero esta diversidad no se había cuantificado. Este nuevo conocimiento puede servir para diseñar estrategias de manejo y control en la región, si en estudios futuros se asocia la variabilidad del patógeno con su resistencia a fungicidas. Además se evidenció la necesidad de establecer criterios de clasificación más amplios e incluyentes, que puedan ubicar a distintos genotipos detectados en el presente estudio y a los aislamientos homotálicos, debido a que los sistemas actuales (US para EE.UU.; EC para Ecuador; CA para Canadá) no los incorporan porque no se tienen en los lugares geográficos o países donde se diseñaron dichos sistemas.

Conclusiones

La población de *Phytophthora infestans* recolectada en el presente estudio presenta gran diversidad genética en la zona de Chapingo, México (índice de 1.8), correspondiente a 24 genotipos de aloenzimas, con el haplotipo mitocondrial Ia y alta frecuencia de homotalismo. La mayoría de los perfiles identificados no coinciden con los de clasificaciones establecidas en otros países.

Conclusions

The population of *Phytophthora infestans* collected in this study revealed high genetic diversity in the Chapingo area, México (1.8 index), corresponding to 24 genotypes of allozymes with mitochondrial haplotype Ia and high frequency of homothallism. Most profiles identified do not coincide with the classifications established for other countries.

—End of the English version—

Literatura Citada

Adler N., F., L. J. Erselius, M. G. Chacón, W. G. Flier, M. E. Ordónez, L. Kroon, and G. A. Forbes. 2004. Genetic diversity of *Phytophthora infestans* sensu lato in Ecuador provides new insight into the origin of this important plant pathogen. Phytopathology 94: 154-162.

Botez, C., V. Florian, I. Oroian, and M. Lecaci. 2007. Analysis of genetic variability at mitochondrial DNA level in some Roumanian *Phytophthora infestans* accessions. Bull. USAMV-CN 63: 127-132.

Fernández P., S. P., A. G. Rodríguez, D. C. R. Belmar, A. K. Sturbaum, W. Flier, y H. Lozoya S. 2005. Caracterización de Aislamientos de *Phytopthora infestans* (Mont.) de Bary provenientes de Michoacán, México. Rev. Mex. Fitopatol. 23: 191-197.

Flier, W. G., N. J. Grünwald, L. P. N. Kroon, A. K. Sturbaum, T. B. M. van den Bosh, E. Garay, H. Lozoya, W. E. Fry, and L. J. Turkensteen. 2003. The population structure of *Phytophthora infestans* from the Toluca Valley of Central Mexico suggests genetics differentiation between populations from cultivated potato and wild *Solanum* spp. Phytopathology 93: 382-390.

Forbes, G., S. B. Goodwin, A. Drenth, P. Oyarzun, M. E. Ordoñez, and W. E. Fry. 1998. A global marker database for *Phytophthora infestans*. Plant Dis. 82: 811-817.

Garay, S. E., P. S. Fernández, A. G. Rodríguez, W. G. Flier, H. Lozoya S., R. I. Rojas, M. E. M. Goss, and N. J. Grünwald. 2007. First report of haplotipe I-b of *Phytophthora infestans* in Central Mexico. Plant Dis. 91: 909.

Gavino, P. D., and W. E. Fry. 2002. Diversity in and evidence for selection on the mitochondrial genome of *Phytophthora infestans*. Mycologia 94: 781-793.

Gilchrist, R. E., V. S. Jaramillo, K. L. A. Afanador, and I. R. E. Arango. 2009. Characterization of *Phytothora infestans* populations in Antioquia, Colombia. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 62: 5031-5037.

Gómez-Alpizar, L., I. Carbone, and J. B. Ristaino. 2007. An Andean origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear gene genealogies. PNAS 104: 3306-3311.

Goodwin, S. B. 1996. Origin and ecology of *Phytophthora infestans*. Rev. Mex. Fitopatol. 14: 143-147.

Goodwin, S. B. 1997. The population genetics of *Phytophthora*. Phytopathology 87: 462-473.

Goodwin, S. B., L. J. Spielman, J. M. Matuszak, S. N. Bergeron, and W. E. Fry. 1992. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in northern and central México. Phytopathology 84: 1224-1227.

Goodwin, S. B., L. S. Sujkowski, and W. E. Fry. 1995a. Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineages of potato late blight disease fungus. Phytopathology 85: 669-676.

Goodwin, S. B., L. S. Sujkowski, A. T. Dyer, B. A. Fry, and W. E. Fry. 1995b. Direct detection of gene flow and probable sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in North America. Phytopathology 85: 473-479.

Goodwin, S. B., C. D. Smart, R. W. Sandrock, K. L. Deahl, Z. K. Punja, and W. E. Fry. 1998. Genetic change within populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada during 1994 to 1996: Role of migration and recombination. Phytopathology 88: 939-949.

Griffith G. W., and D. S. Shaw. 1998. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. Appl. Environm. Microbiol. 64: 4007-4014.

Grünwald, N. J., and W. G. Flier. 2005. The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. Ann. Rev. Phytopathol. 43: 171-190.

Grünwald, N. J., W. G. Flier, A. K. Sturbaum, S. E. Garay, T. B. M. Van den Bosch, C. D. Smart, J. M. Matuszak, H.

Lozoya, L. J. Turkensteen, and W. E. Fry. 2001. Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca Valley Region of central Mexico. Phytopathology 91: 882-890.

Hebert, P. D., and J. M. Beaton. 1993. Methodologies for alloenzyme analysis using cellulose acetate electrophoresis. A practical handbook. Helena Laboratories. Guelph, Ontario. 32 p.

Hernández, G., K., e I. G. Gómez. 2005. Aplicación de marcadores bioquímicos y moleculares en el estudio de poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary causante del tizón tardío en papa y tomate. Fitosanidad 9: 39-50.

Jaimasit, P., and W. Prakob. 2010. Characterization of *Phytophthora infestans* population in potato crops from Chiang Mai and Tak Provinces. J. Agric. Technol. 1: 117-125.

Krause, R. A., L. B. Massie, and R. A. Hyre. 1975. Blightcast: A computerized forecast of potato late blight. Plant Dis. Rep. 59: 95-98.

Lozoya S., H., G. L. Guzmán, P. S. Fernández, N. J. Grünwald, and E. McElhinny. 2005. *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. I. Host–Pathogen specificity and resistance components. Agrociencia 40: 205-217.

Lozoya S., H., D. Perales-Rosas, S. P. Fernández-Pavía, and N. J. Grünwald. 2006. Characterization of *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. II. Subpopulations obtained from wild *Solanum* species. Agrociencia 40: 325-333.

Matuszak J. M., E. J. Fernandez, M. Villareal G., and W. E. Fry. 1994. Sensitivity of *Phytophthora infestans* populations to metalaxyl in Mexico: Distributions and dynamics. Plant Dis. 78: 911-916.

Moreno, E. C. 2001. Métodos para Medir la Biodiversidad. M&T Manuales y Tesis SEA, vol 1 Zaragoza, España. 84 p.

Pérez, W., y G. Forbes. 2008. Manual técnico. El Tizón tardío de la papa. CIP. Lima, Perú. 39 p.

Silva, B., S. Jaramillo, y M. Marin. 2009. Caracterización genética de aislamientos de *Phytophthora infestans* en las zonas productoras de papa de los departamentos de Antioquía, Boyacá, Cundinamarca y norte de Santander (Colombia). Actual Biol. 31: 5-20.

Spielman, L. J., A. Drenth, L. C. Davidse, L. J. Sujkowski, W. Gu, P. W. Tooley, and W. E. Fry. 1991. A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*. Plant Pathol. 40: 422-430.

Spooner, D. M., R. G. van den Berg, A. Rodríguez, J. Bamberg, R. J. Hijmans, and S. I. Lara Cabrera. 2004. Wild Potatoes (Solanum Section Petota; Solanaceae) of North and Central America. The American Society of Plant Taxonomists. Systematic Botany Monographs 68: 209.

Wangsomboondee, T., C. T. Groves, P. B. Shoemaker, M. A. Cubeta, and J. B. Ristaino. 2002. *Phytophthora infestans* populations from tomato and potato in North Carolina differ in genetic diversity and structure. Phytopathology 92: 1189-1195.